



TITLE:

膀胱腫瘍の臨床病理学的研究 --免疫組織化学の細胞診への応用--

AUTHOR(S):

長田, 恵弘; 木下, 英親; 河村, 信夫; 笹平, 秀一

---

CITATION:

長田, 恵弘 ...[et al]. 膀胱腫瘍の臨床病理学的研究 --免疫組織化学の細胞診への応用--. 泌尿器科紀要 1985, 31(11): 1931-1937

ISSUE DATE:

1985-11

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/118668>

RIGHT:

## 膀胱腫瘍の臨床病理学的研究

—免疫組織化学の細胞診への応用—

東海大学医学部泌尿器科学教室（主任：河村信夫教授）

長 田 恵 弘  
木 下 英 親  
河 村 信 夫

東海大学医学部病理学教室（主任：渡辺慶一教授）

笹 平 秀 一

CLINICOPATHOLOGICAL STUDY OF  
URINARY BLADDER TUMOR

—CLINICAL EVALUATION OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN URINE CYTOLOGY—

Yoshihiro NAGATA, Hidechika KINOSHITA and Nobuo KAWAMURA

*From the Department of Urology, School of Medicine, Tokai University**(Director: Prof. N. Kawamura)*

Shuichi SASADAIRA

*From the Department of Pathology, School of Medicine, Tokai University**(Director: Prof. K. Watanabe)*

We report on the immunohistochemical detection of carcinoembryonic antigen in the urine cytology of 5 patients with urinary bladder tumors classified as low, moderate, and high grade. Immunohistochemically carcinoembryonic antigens were detected in urine cytology in the case of moderate and high grade tumors, but not, low grade tumors. Carcinoembryonic antigen positivity in urine cytology correlated with the histological grade of a bladder tumor. Carcinoembryonic antigen in urine cytology seemed to be a potentially good marker to distinguish between high grade and low grade tumors.

**Key words:** Bladder tumor, Urine Cytology, Immunohistochemistry, Carcinoembryonic Antigen

## 結 言

尿細胞診は、膀胱腫瘍の悪性度判定に重要な位置を占めている。従来より、パバニコロー染色標本を主体に、細胞の異型度により、その悪性度や治療効果の判定に用いられている。いっぽう、腫瘍マーカーとして、前立腺癌における酸性フォスファターゼ、肝細胞癌や睾丸腫瘍における alpha-fetoprotein（以下 AFP と略す）、絨毛癌における HCG (human chorionic gonadotrophine) などは、臨床上有用に用い

られている。癌胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen 以下 CEA と略す) も膀胱腫瘍における腫瘍マーカーとして、検討がおこなわれている。近年、このような腫瘍抗原が免疫化学的な手技で担癌担者から、検出され、微量の抗原も、radioimmunoassay 法により、検出可能になり、癌組織ばかりでなく、担癌患者の血液でも、検出され、癌診断や治療の follow up に用いられるようになった。

1965年 Gold and Freedman が結腸癌組織より発見した CEA は当初、結腸癌の腫瘍特異抗原と考えら

れていたが、測定法の改善により、非消化器性悪性腫瘍患者血中にも検出され、腫瘍関連抗原のひとつとして、考えられるようになった。膀胱腫瘍内の CEA の局在についても Willey ら<sup>3)</sup>が報告している。今回、われわれは、膀胱腫瘍患者より採取した尿中剝離細胞を用いて、CEA の局在を酵素抗体法で、検索してみたので、若干の文献的考察を含めて、報告する。

### 検 査 対 象

対象は5例、年齢46歳～83歳（平均63.8歳）の膀胱腫瘍未治療患者で、男性3名、女性2名である。主訴は、第4症例以外、肉眼的血尿であった。第4症例は、46歳の男性で、職業は理髪師であり、職域健診にて、胸部X-P造影時、多発性異常胸部陰影を指摘され、原発巣を検索したところ、膀胱腫瘍と診断された症例であった。

膀胱腫瘍は膀胱癌取り扱い規約に従い、膀胱鏡所見、組織型、異型度、浸潤度を分類した。パパニコロー染色による尿中剝離細胞診は頻回に施行したが、Table 1 には、全経過中もっとも、high class のものを記載し、血中 CEA は原則として、その尿が得られた時点の測定値を記載した。

### 方 法

尿中剝離細胞診は検体採取後ただちに、遠沈器を用いて、1,000 rpm で10分間遠沈した沈渣を用いておこなった。遠沈後、上清を棄て、細胞成分のみを 0.01 M PBS にて10分間水洗を3回おこなった後、4°C で、4% Perodate Lysine Paraformaldehyde で

固定した。固定後、10% 15% 20% Sucrose 含有 0.01 m PBS にて、10分間水洗を各3回おこない、凍結切片を作製した。早朝尿は、膀胱中の滞留時間が長く、剝離細胞の変性も強く、かつ、CEA の抗原性も低下すると思われるため、今回の検体としては、用いないこととした。

CEA の免疫組織化学染色は、磯辺の方法<sup>4)</sup>でおこなった。すなわち、ペルオキシダーゼ標識酵素抗体法間接法を用いて、抗ヒト CEA 兎 Ig G を一次抗体として使用し、二次抗体として、ペルオキシダーゼ標識抗兎 Ig G 山羊 Ig G を使用し、DAB 反応にて発色させて、CEA の局在を観察した (Table 2)。

尿中浮遊細胞採取のさい、赤血球除去には 0.83% NH<sub>4</sub>Cl 水溶液と Tris-hydroxymethyl aminomethane 20.594 g を 500 ml 蒸留水に溶解し、IN-HCl で、PH 7.65 に調節し、これを 9:1 の比率で混合した水溶液を buffer として使用した。

### 結 果

症例(1)から(5)のうち、典型的3症例を提示する。

症例1:55歳女性。移行上皮癌 Grade-I Stage T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>、尿細胞診は5回施行し、すべて class-I であった。治療は、1983年7月に、TUR-BT を施行。その後、後療法として Carboquone 5 mg 5-FU 250 mg Cytosine Arabinocide 100 mg で再発予防のため、膀胱内注入療法を施行している症例である。

尿中剝離腫瘍細胞内には、Fig. 1 の矢印で示したように、CEA の局在は認められず、陰性であった。

症例3:82歳男性。移行上皮癌 Grade 2>3 Stage

Table 1. 検索された膀胱腫瘍

症例	年齢	性	膀胱鏡所見	組織型・異型度	尿細胞診 Class	分類	治療	血清CEA 術前/術後
症例1	55	F	乳頭状有茎性 多 発 左 右 側 壁	移行上皮癌 grade 1	I	T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	TUR-BT 注入療法	
症例2	53	M	乳頭状有茎性 単 発 右 側 壁	移行上皮癌 grade 3	III	T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	TUR-Bx 膀胱全摘	3.6 1.9 ng/ml
症例3	82	M	乳頭状有茎性 単 発 三角部～右側壁	移行上皮癌 grade 2 > 3	V	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	TUR-BT	6.4 6.6 ng/ml
症例4	46	M	非乳頭状広基性 単 発 頂 部	移行上皮癌 grade 3	V	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>1</sub>	TUR-BT	17.4 24.5 ng/ml
症例5	83	F	乳頭状広基性 単 発	移行上皮癌 grade 3	V	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	TUR-BT 温熱療法 OK 432	1.2 0.5 ng/ml

Table 2. 免疫組織化学

1. 浮遊細胞 (遠沈1000rpm10分間)	1. 膀胱腫瘍	1. 膀胱腫瘍
2. 水洗 PBS 10分間 3回	10%ホルマリン固定	Periodate-Lysin-4%
3. Periodate-Lysin-4%		Paraformaldehyde
Paraformaldehyde(PLP)		4% 8時間
固定 4℃ 30分間		水洗 PBS 2時間 3回
4. 水洗10分間 3回	脱パラフィン切片	(10%.15%.20% Sucrose 含有)
(10%.15%.20% Sucrose含有)		凍結切片作製 (6μ)
5. 凍結切片作製 (6μ)		
	6. 水洗 PBS 3回10分間	
	7. 内因性ペルオキシダーゼ活性の除去	
	(50mM Periodic acid (30分間))	
	8. 水洗 PBS	
	9. 30mM Sodium borohydride (30分間)	
	10. 水洗 PBS	
	11. 一次抗体 (抗ヒト CEA 兎 IgG)	
	12. 水洗 PBS	
	13. 二次抗体 (ペルオキシダーゼ標識抗兎 IgG山羊 IgG)	
	14. 水洗 PBS 3回10分間	
	15. DAB 反応	
	16. 水洗 PBS	
	17. 核染色 (1%メチルグリーン)	

T<sub>2</sub>N<sub>x</sub>M<sub>0</sub>, 尿細胞診は総計12回施行し, class I 4回, class II 1回, class III 3回, class IV 2回, class V 3回であった. 治療方針としては, 膀胱全摘すべき症例であったが, 年齢が82歳と高齢であるため, TUR-BT と TUC で対症的に治療をおこなった.

Fig. 2, Fig. 3 は, 尿中剝離細胞の CEA 局在の検討をおこなったものである. 矢印のように腫瘍細胞内に, あきらかに CEA の局在が認められ, 陽性と判定した.

症例4 46歳男性. 移行上皮癌 Grade 3 Stage T<sub>3</sub>N<sub>0</sub>M<sub>1</sub>, 尿細胞診は, 6回施行した. 結果は, class I 1回, class IV 1回, class V 4回であった. 本症例は, 膀胱腫瘍発見時に, すでに肺転移をきたしており, 根治手術の適応がないため, TUR-BT で出血のコントロールをおこなった. Fig. 5 は, TUR-BT で切除された膀胱腫瘍の凍結切片を用いて, CEA の局在を検討したものである. 腫瘍組織は, 乳頭状に増殖を示し, CEA は Fig. 5 に認められるように, 腫瘍細胞表層に局在を示している.

つぎに, 同一症例の尿中剝離細胞の凍結切片を用いて, CEA の局在を検討した. Fig. 6 は, 剝離細胞の凍結切片を抗 CEA 抗体で染色したものである. 膀胱

粘膜から剝離の時間の経過や尿中 PH, 体温などの影響があり, 細胞の変性や形態学的変化は, 膀胱腫瘍切除標本と比較すると著しく異なっているが, 腫瘍細胞内の CEA の局在は, 陽性であり, 組織の CEA 所見と同様であった. 症例2: 53歳男性. 移行上皮癌 Grade III および, 症例4: 46歳男性. 移行上皮癌 Grade III は, いずれも high grade tumor の症例であり, CEA は組織標本, 剝離細胞とも陽性であり, 異型度の強い膀胱腫瘍では, 組織標本でも, 尿中剝離細胞でも, CEA が陽性であることが示された.

## 考 察

膀胱腫瘍の浸潤度の判定や治療方針の決定には, 膀胱鏡, 排泄性腎盂造影, CT-scan, 超音波検査, 双手診などが有用である. いっぽう, 細胞診は, すでに100年以上も前からおこなわれていたが, ほとんど注目されず, 1942年, Papanicolou<sup>5)</sup> が子宮頸癌についての診断的価値を, また, 1947年には, 尿中剝離細胞診<sup>6)</sup> による尿路悪性腫瘍の診断法と, その価値を報告して以来, 臨床的価値が再認識された. とくに膀胱腫瘍では, 尿中剝離細胞診が, 診断確定に重要な位置を占めている. パパニコロー染色による尿中剝離細胞

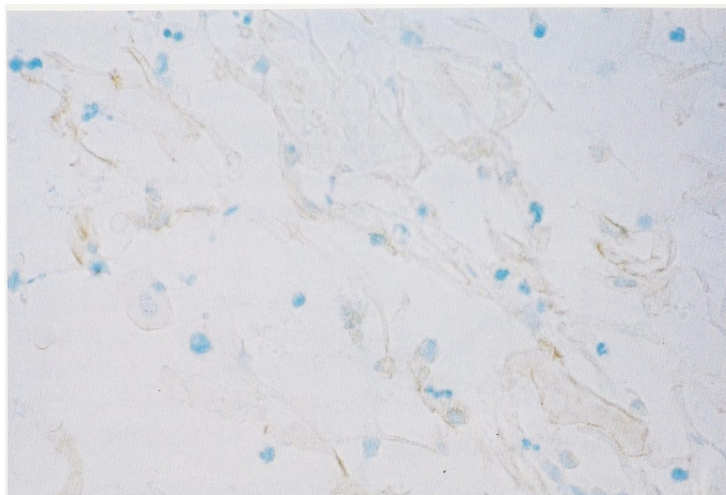


Fig. 1. 腫瘍細胞（矢印）の  
CEA 局在；陰性

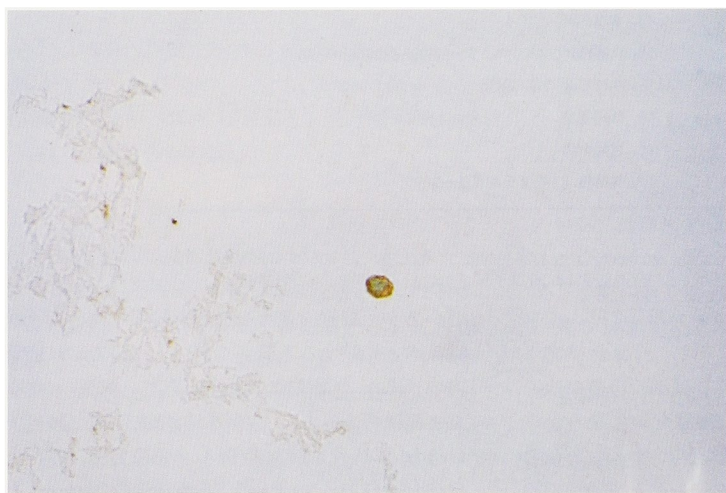


Fig. 2. 腫瘍細胞（矢印）は  
尿中のため変性が著  
しい。  
CEA の局在は陽性

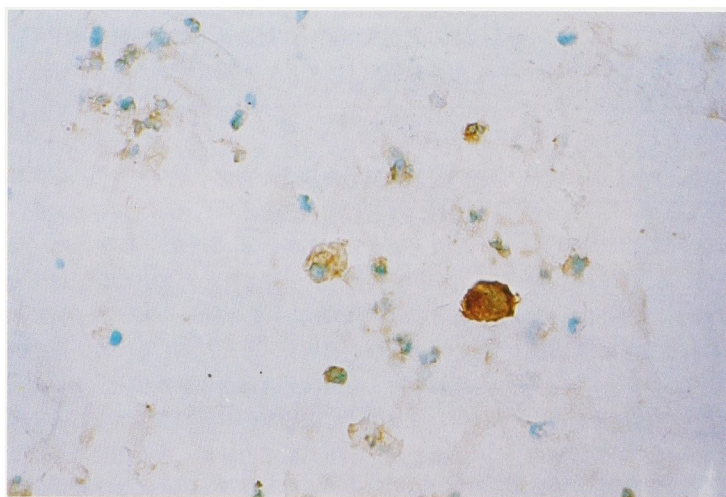


Fig. 3. 腫瘍細胞（矢印）は  
尿中のため変性が著  
しい。  
CEA の局在は陽性



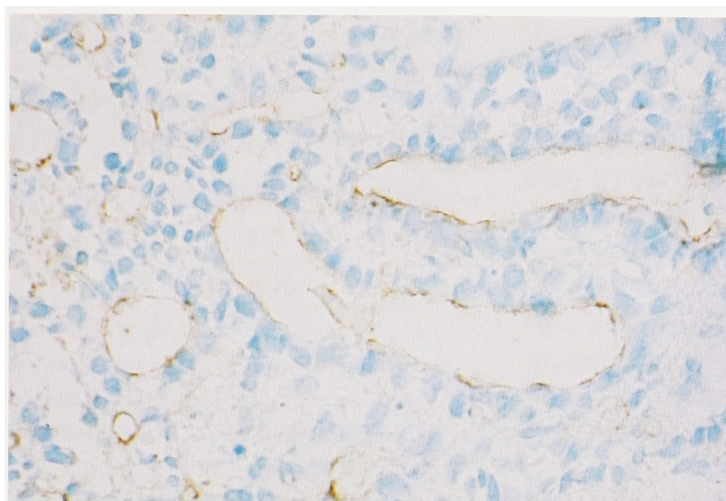


Fig. 4. 凍結切除切片  $\times 400$   
CEA は細胞表面に  
局在を示す



Fig. 5. 腫瘍細胞は塊状を  
呈し CEA 陽性

診の陽性率については、諸家の報告がある。林田ら<sup>2)</sup>は、膀胱腫瘍の異型度を Grade I~II までを low grade とし、Grade III~IV を high grade とし、2つに分類し、尿中剝離細胞の異型度を class III 以上を陽性として、陽性率を検討した場合、high grade の膀胱腫瘍のほうが、陽性率が高いという。これについては、われわれも、症例数が少ないが、症例3、症例4、症例5のように high grade の膀胱腫瘍は、尿中剝離細胞診で、その陽性率は高く、同定な結果を得ており、諸家の報告と一致する。

いっぽう、CEA は、1965年に Gold and Freedman によって、結腸癌の診断および、その再発、転移の follow up に有用なマーカーとされていた。近年、微量の抗原でも、radioimmunoassay 法により、

検出可能となり、CEA は結腸癌だけでなく、乳癌、肺癌、尿路系悪性腫瘍などの担癌患者からも検出されるようになり、腫瘍関連抗原として考えられるようになった。伊東<sup>2)</sup>は、膀胱が消化管と同じ内胚葉由来の臓器であることに注目し、検討をおこなったところ、膀胱癌患者の血漿 CEA が上昇している症例があり、正常健康人と比して、有意差あり、と報告し、また Wechsler ら<sup>10)</sup>も膀胱腫瘍患者では、その侵潤度に相関すると報告している。われわれの症例では、CEA 高値例は1例のみである。検討症例数が5例と少なく、また、血漿 CEA を検討する場合、健康正常人では、加齢とともに、血漿 CEA が高値を示すと述べ、喫煙者のほうが非喫煙者よりも血漿 CEA 値は高くなる傾向があると報告している<sup>11,12)</sup>。今後、血漿 CEA

値については、症例数を増やし、さらに検討を加える必要があると思われる。

尿中剝離細胞中の CEA の観察は酵素抗体間接法を用いて、腫瘍細胞の異型別におこなった。

すなわち、症例を Tumor の Grade により、low grade, moderate grade, high grade, に分類した。異型度の高い腫瘍程、剝離細胞数が多く、パパニコロー染色でも陽性を示す。これは、EL-Balkainy の報告と同様である<sup>13)</sup>。症例 1 のように low grade low stage の場合では、剝離腫瘍細胞がきわめて少なく、酵素抗体法による CEA の局在を認めることができなかった。症例 4、症例 5 のように、腫瘍の異型度が、高い症例では、剝離腫瘍細胞は多く、CEA の局在も DAB 反応により発色させ、検索すると腫瘍細胞は陽性である。

しかし、剝離細胞を用いた酵素抗体法による CEA の局在を検討する場合、細胞自身の変性、酵素活性の低下、尿中の影響、症例数などの種々検討しなければならない因子が存在するが、膀胱腫瘍細胞の CEA の局在は、腫瘍細胞の異型度と相関を示した。異型度の高い腫瘍では、剝離細胞の中の腫瘍細胞も多く、CEA 陽性細胞も多い。その反対に、異型度の低い腫瘍細胞では、剝離細胞も少なく、CEA 陽性細胞は、ほとんど認めなかった。このことから、膀胱腫瘍の異型度が増すにしたがって、CEA 陽性細胞が増加するものと思われた。Willey ら<sup>3)</sup>は、膀胱腫瘍組織の CEA の陽性率を報告している。それによると、膀胱腫瘍細胞の病理組織学的侵潤度、異型度とは相関がなく、大部分の腫瘍組織内で陽性となるという。症例 4、症例 5 においては、膀胱腫瘍組織内の局在も検討したが、CEA は細胞表面に近い部位で、局在を示すように思われた。従来の消化器系腫瘍を用いての CEA の局在についての検討では、癌細胞表面の最外層にあるグリコカリックス中にあるという<sup>14,15)</sup>。泌尿器系腫瘍の場合、CEA の局在については、十分に検討がおこなわれた報告はない。今回われわれの施行した結果では、膀胱腫瘍細胞表面に CEA の局在が示されることが、消化器系腫瘍と同様に癌細胞表面に CEA が局在すると思われる。剝離細胞を用いて、CEA の陽性率を検討した場合、異型度と相関し、腫瘍組織の場合と相反する結果がでた。

## 結 語

1) 膀胱腫瘍の臨床病期と組織分類および細胞分類を対比し、腫瘍細胞の CEA 局在を検討した結果、剝離細胞の CEA 局在は異型度の強い腫瘍細胞に陽

性であった。

2) 酵素抗体法を応用した尿中剝離細胞診は腫瘍細胞の悪性度とともに機能的分化度の同定の一手段として、有用な方法として考えられた。

3) この方法を改良することにより、膀胱腫瘍の再発をより早期に知ることにも可能になると考えられた。

本研究は、第72回日本泌尿器学会総会（徳島）において、発表した。

## 文 献

- 1) Gold P and Freedman SO: Demonstration of tumor specific antigens in human colonic carcinoma by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med* **121**: 439~459, 1965
- 2) 伊東三喜雄: 泌尿器科領域の悪性腫瘍における癌胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen) 第 1 報 臨床的意義. *泌尿紀要* **22**: 555~564, 1976
- 3) Willey EL, Mendelsohn G, Drolley MJ and Eggleston JC: Immunoperoxidase Detection of Carcinoembryonic antigen and Blood group substance in Papillary Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *J Urol* **128**: 276~280, 1982
- 4) 渡辺慶一: 酵素抗体法 一理論・手技解説とその応用一. 学際企画, 東京, 1981
- 5) Papanicolaou GN: A new procedure for vaginal smears. *Science* **95**: 438~439, 1942
- 6) Papanicolaou GN: Cytology of the urine sediment in neoplasia of the urinary tract. *J Urol* **57**: 375~379, 1947
- 7) 林田重昭・桐山富夫・山本憲男・平山 嗣: 尿剝離細胞診の臨床的価値. *癌の臨床* **19**: 482~487, 1973
- 8) Mach JP, Vinney H, Jaeger P, Haldeman B, Egely R and Pettavel J: Long-term follow up of colorectal carcinoma patients by repeated CEA radioimmunoassay. *Cancer* **42**: 1439~1447, 1978
- 9) Mintin JP and Martin EW Jr: The use of serial CEA determinations to predict recurrence of colon cancer and when to do a secondlook operation. *Cancer* **42**: 1422~1427, 1978
- 10) Wechsler M, LoGerfo P, Feminella J and Lattimer JK: The cancer associated antigen

- tests as an index to failure of complete removal of urological cancers. *J Urol* **109**: 699~701, 1973
- 11) Alexander JC, Silverman NA and Chretien PB: Effect of age and cigarette smoking on carcinoembryonic antigen levels. *JAMA* **235**: 1975~1979, 1976
  - 12) Stevens DP and Mackay IR: Increased carcinoembryonic antigen in heavy smokers. *Lancet* **2**: 1238~1239, 1973
  - 13) EI-Bolkainy MN: Cytology of Bladder carcinoma. *J Urol* **124**: 20~22, 1980
  - 14) Von Kleist S and Burtin P: Cellular localization of an embryonic antigen in human colonic tumors. *Int J Cancer* **4**: 874~879, 1969
  - 15) Gold P, Krupey J and Ansari J: Position of the carcinoembryonic antigen of the human digestive system in ultrastructure of tumor cell surface. *J Nat Cancer Inst* **49**: 219~225, 1970

(1985年3月5日受付)